

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 617—623, November 1969

Veränderungen der Gc-Varianten durch enzymatische Einwirkungen¹⁾

Von R. HILGERMANN

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Marburg (Direktor: Prof. Dr. F. Schleyer)

(Eingegangen am 30. Juni 1969)

Die intrazellulären Proteasen (Kathepsine) bewirken nach ihrer Freisetzung (Hämolyse) deutliche immunoelektrophoretisch darstellbare Transformationen der Gc-Globuline und einiger anderer Serumproteine. Eine Inaktivierung dieser Kathepsine durch bekannte polyvalente Proteasen-Inhibitoren war nicht möglich. Hinsichtlich ihrer Proteinsubstratspezifität besteht keine biochemische Identität zwischen den Kathepsinen und den proteolytischen Verdauungsenzymen (Endopeptidasen).

Alterations of the Gc-variants by enzyme action

The intracellular proteases (cathepsins) induce distinct immunoelectrophoretic transformations of the group-specific component (Gc) and other serum proteins after their liberation by haemolysis. These cathepsins could not be inactivated by polyvalent protease inhibitors. With regard to their protein substrate specificity, there is no biochemical identity between the cathepsins and the proteinsplitting enzymes (endopeptidases) secreted into the gastrointestinal tract.

SCHULTZE und SCHWICK (1) haben untersucht, in welchem Maße chemisch-physikalische, fermentative und Einwirkungen durch Krankheiten das Bild der Immuno-elektrophorese zu beeinflussen vermögen. Unter diesen Faktoren führt die Einwirkung *proteolytischer Fermente* zu den stärksten Veränderungen in der Proteinstruktur: Dislokation, Doppelkonturierung, Aufteilung, Abschwächung oder sogar Verschwinden typischer Immunpräzipitate. LEITHOFF und LEITHOFF (2) stellten bei der immunoelektrophoretischen Differenzierung der Proteine faulen Leichenblutes eine gewisse Rangordnung des Schwundes der Proteinfractionen auf, die auch von anderen Autoren bestätigt wurde (3, 4). Danach ist, von einigen Ausnahmen abgesehen, die Stabilität gegenüber Fäulnis und Autolyse eine Funktion der Quantität: die quantitativ stärksten Proteinfractionen widerstehen fermentativen Einflüssen am längsten.

Hieraus ist abzuleiten, daß die quantitativ geringeren, niedermolekularen und sich in sehr feinen Präzipitatlinien abzeichnenden Gc-Proteine naturgemäß früher und schwerer geschädigt werden (3). Daß die Wirkung proteolytischer Eigenfermente der Blutzellen und zahlreicher Bakterienfermente die Ursache der immunoelektrophoretisch nachweisbaren Veränderungen der gruppenspezifischen Komponente ist, wurde von NERSTRØM (5, 6) und NERSTRØM und Mitarbeitern (7, 8) durch systematische Untersuchungen bewiesen. Im Vordergrund stehen auch hier Unregelmäßigkeiten der Wanderung der Gc-Präzipitate und ihrer sog. Leitpräzipitate oder Bezugsbögen. Bei fortgeschrittener „Transformation“ kommt es zum Auftreten eines immunologisch mit der gruppenspezifischen Komponente identischen α_1 -Globulins.

Inzwischen liegen weitere Kenntnisse über Transformationen der Gc-Präzipitate u. a. nach thermischen Einflüssen, an Leichenblut, Blutspuren und an gelagertem Blut in Abhängigkeit vom Zeitfaktor vor (3, 4, 9, 10, 11, 12, 13).

¹⁾ Als Kurzvortrag gehalten auf der Tagung der Gesellschaft für forensische Blutgruppenkunde, Travemünde 1969.

Die Transformation der Gc-Typen und der Serumproteine durch freigesetzte proteolytische Fermente aus desintegrierten Leukocyten und Thrombocyten gilt wohl als unumstritten. Umstritten ist aber die Frage, welche *intrazellulären Enzyme* für diese Proteolyse verantwortlich sind.

Auf der Suche nach den am katabolen intrazellulären Proteinstoffwechsel beteiligten Hydrolasen wurden bisher in tierischen und zum Teil auch in menschlichen Geweben die *Kathepsine* A bis E beschrieben (14). Für die Kathepsine A bis D konnte ihre lysosomale Lokalisation nachgewiesen werden (15, 16, 17, 18 u. a.). Als Lysosomen bezeichnet man eine Gruppe von zyttoplasmatischen Teilchen, die bei der üblichen Zellfraktionierung als eine Mittelfraktion zwischen Mitochondrien und Mikrosomen auftritt. Kathepsin ist eine Sammelbezeichnung für die Vielzahl der proteolytischen Enzyme in den *Gewebszellen* mit verschiedenen pH-Optima und Spezifitäten. Nach ihrer Spezifität gegenüber synthetischen Substraten bestehen gewisse Ähnlichkeiten des Kathepsins A mit dem Pepsin, des Kathepsins B mit dem Trypsin und des Kathepsins C mit dem Chymotrypsin. Die proteolytische Hauptaktivität dürfte den Kathepsinen der Gruppe D zukommen, für die bisher keine synthetischen Substrate gefunden wurden, und die von FRUTON (19) als „hämoglobinspaltende“ Kathepsine bezeichnet wurden (14). Da es bisher nicht gelungen ist, diese zellulären Enzyme in kristalliner Form rein darzustellen, bestehen noch viele Unklarheiten hinsichtlich Identität und spezifischer Eigenschaften der einzelnen Kathepsine.

Ähnlich unbefriedigend sind aus den gleichen Gründen die bisherigen Erkenntnisse über die proteolytischen Enzyme der *Blutzellen*. Nach PANTLITSCHKO und STATTMANN (20) kommt eine Protease mit einem pH-Optimum bei 7,4 in den *Leukocyten* vor, die nach ihrem Verhalten gegen verschiedene Substrate nicht mit Trypsin identisch ist, wie früher angenommen wurde. Außerdem werden ein Kathepsin mit einem pH-Optimum von 4,5 und Peptidasen in den Zellen der myeloischen und der lymphatischen Reihe beschrieben. HASCHEN und Mitarbeiter (21, 22) fanden in Übereinstimmung mit FREI und Mitarbeitern (23) eine neutrale Protease (pH 7,5) in den Leukocyten; ferner beschrieb HASCHEN (21, 22) noch eine saure Protease (pH 3,5) und 7 Peptidasen einschließlich einer katheptischen Carboxypeptidase. MOUNTER und ATIYEH (24) haben 3 katheptische Enzymaktivitäten gemessen, eine in Leukocyten mit einem pH-Optimum von 8,0, die dem Chymotrypsin ähneln soll, und 2 weitere aus Lymphocyten mit einem pH-Optimum von 3,0 und 5,5. STILES und FRAENKEL-CONRAT (25) beschrieben gleichfalls zwei pH-Optima bei 3,5 und

8,5; sie wiesen ein Überwiegen der sauren Protease bei den Lymphocyten und der alkalischen Protease bei den Leukocyten nach. Ferner konnten sie zeigen, daß die proteolytischen Aktivitäten, wenn auch in unterschiedlicher Verteilung, praktisch in allen Zellfraktionen vorhanden sind, also nicht nur in den neutrophilen Granula der Leukocyten, die nach Aufbau und Enzymgehalt als Lysosomen anzusehen sind (26).

Die menschlichen *Thrombocyten* enthalten ein Kathepsin A, eine Protease-Aktivität bei pH 3,5 und sechs weitere Exopeptidasen, die hinsichtlich pH-Optimum, nicht aber quantitativ mit den Erythrocyten-Enzymen übereinstimmen (27, 28). Auf das Zellvolumen bezogen, übertrifft ihre Aktivität sogar diejenige intra-leukocytärer Fermente (29).

Bemerkenswert ist schließlich, daß auch die *Erythrocyten* neben zahlreichen Peptidasen eine Protease-Aktivität mit einem pH-Optimum bei 7,4 aufweisen und eine saure Protease mit einem pH-Optimum bei 3,0, die in ihrem Verhalten dem Kathepsin D nahesteht (30, 31, 32).

NERSTRØM (6) hat nachgewiesen, daß die Gc-Komponenten durch die Proteasen aus Leukocyten und Thrombocyten *getrennt* voneinander in ähnlicher Weise transformiert werden. Es ergab sich nun die praxisnahe Fragestellung, ob sich die intrazellulären Proteasen mit einem der bekannten polyvalenten Protease-Inhibitoren *inaktivieren* lassen, und so das Auftreten von Gc-Defekttypen vermeidbar ist. Gleichzeitig war zu prüfen, ob sich bei einer spezifischen Hemmung dieser Zellfermente und durch den Vergleich transformierter Gc-Typen mit den Präzipitatemustern, die nach Einwirken bekannter *Verdauungsfermente* entstehen, gewisse Übereinstimmungen im proteolytischen Verhalten der Fermentsysteme der *Blutzellen* und des *Verdauungstraktes* nachweisen lassen; denn diese Identität ist biochemisch noch keineswegs geklärt.

Material und Methoden

Herstellung der Substrate

Leukocyten und Thrombocyten wurden aus den bei der Plasmaherstellung gewonnenen Blutzellen frischer Blutkonserven isoliert²⁾. Die Zellen wurden in 0,85proz. NaCl-Lösung suspendiert und 3mal bei 3000 U./Min. zentrifugiert. Dabei wurden jeweils die obersten erythrocytenfreien Zellschichten sorgfältig abgehoben, anschließend unter Kühlung mit einem Ultra-Turrax (Janke & Kunkel, 7813 Staufen) homogenisiert und schließlich bei -20° aufbewahrt. Eine weitere Trennung der Leukocyten von Lymphocyten und Thrombocyten wurde nicht vorgenommen.

Erythrocyten wurden aus frisch entnommenem Citratblut nach dem von BETKE (33) angegebenen Verfahren isoliert, gleichfalls homogenisiert und bei -20° eingefroren. Die Erythrocyten-suspension wurde außerdem im Blutausstrich sowie in der Zählkammer nach Zusatz von HAYEMscher Lösung mikroskopisch auf Leukocytenfreiheit geprüft.

Proteolytische Fermente

1. Kristallines Trypsin (Novo), 24,2 Anson-Trypsineinheiten/g;
2. Kristalline Bakterienproteinase (Novo), entsprechend 22,2 Anson-Trypsineinheiten/g;
3. Kristallines Pepsin (Serva), kristalline Suspension, diisopropylfluorophosphat-behandelt, d. h. frei von Chymotrypsin, Trypsin und Aminosäuren.

Alle Fermentversuche wurden mit kristalliner Substanz angesetzt, um zusätzliche Serumverdünnungen zu vermeiden, da

²⁾ Die Sedimente wurden freundlicherweise von den Behringwerken, Marburg, zur Verfügung gestellt.

bereits bei Zugabe der Fermentinhibitoren zum Teil beträchtliche Serumverdünnungen in Kauf genommen werden mußten.

Fermentinhibitoren

Trasylol (Bayer), ist ein polyvalenter Inhibitor von Trypsin, Chymotrypsin, Kallikrein und Plasmin. Die Trypsinhemmkapazität zählt zu den höchsten bisher gefundenen. Zusammenfassung der Literatur bei VOGEL, TRAUTSCHOLD und WERLE (34). Pepsin wird durch Trasylol weder gehemmt noch wird Trasylol durch Pepsin angegriffen (35). Kathepsin C, Carboxypeptidase und die meisten Bakterienproteinasen werden durch Trasylol nicht gehemmt (36, 37). Nach BARNHART (38) soll Trasylol dagegen Kathepsin D und andere leukocytäre, lysosomale Proteasen hemmen. 1 mg Trypsin wird durch 1250 Kallikrein-Inaktivator-Einheiten (KIE) Trasylol inaktiviert. Verwendet wurden Ampullen zu je 5 ml, entsprechend 25000 KIE.

Diisopropylfluorophosphat (Schuchardt), ein hochtoxisches, öliges, organisches Phosphat, ist ein polyvalenter Esterasenhemmer. Diisopropylfluorophosphat hemmt Cholinesterase, Trypsin, Chymotrypsin und Kallikrein (39, 40), nicht aber Kathepsin B und C (19), Kathepsin D (41) und tryptische Carboxypeptidase (42). Es hemmt Trypsin komplett bei 0,4 mm. Da die Angaben in der Literatur über die zur Hemmung erforderlichen Konzentrationen erheblich schwanken, andererseits die zellulären Enzymaktivitäten nicht bekannt waren, wurde willkürlich eine 0,1M Diisopropylfluorophosphat-Lösung hergestellt und den Reagenzien in steigenden Mengen zugesetzt.

Saponin, als 0,1proz. Lösung, soll nach MOUNTER und ATIYEH (24) eine völlige Hemmwirkung gegenüber Pepsin besitzen.

Phenylmethylsulfonylfluorid (Serva), von FAHRNEY und GOLD (43) als Ersatz für das sehr toxische Diisopropylfluorophosphat empfohlen, hemmt gleichfalls Trypsin und Chymotrypsin. Es war für diese Versuchsreihen jedoch unbrauchbar, da es sich nur in Isopropanol lösen ließ (Eiweißdenaturierung).

Immunoelktrophorese

Die Immunoelktrophorese wurde unter Verwendung des Barbitol-Calciumlactatpuffers nach HIRSCHFELD (44, 45) entsprechend einer früher mitgeteilten Modifikation (46) der von BAITSCH und Mitarbeitern (47) angegebenen Variante der immunoelktrophoretischen Mikromethode auf Glasplatten vorgenommen. Die 115×300 mm messenden Spiegelglasplatten als Gelträger lassen in einem Untersuchungsgang maximal 80 Einzelbestimmungen zu. Als Immunseren dienten Anti-Gc-Seren vom Pferd und von der Ziege sowie ein monospezifisches Anti-Gc-Serum vom Kaninchen.

Beschreibung der Versuche

Vollblut und Citratblut der 3 Gc-Typen wurden zur Freisetzung der Zellproteasen mehrfach bei -20° eingefroren und aufgetaut. Diese Proben und nichtgefrorene Kontrollen wurden 1–4 Stdn. bei 37° inkubiert und anschließend immunoelktrophoretisch untersucht.

Frische Serumproben der 3 Gc-Typen wurden mit abgestuften Mengen homogenisierter Leuko- und Thrombocyten sowie leukocytenfreier Erythrocyten versetzt, und zwar jeweils 0,2 ml Serum mit 0,001, 0,01 und 0,1 ml unverdünnter Leukocyten-Thrombocytenaufschwemmung und jeweils 0,5 ml Serum mit 0,5 ml Erythrocytenhämolyat. Alle Proben wurden mehrfach eingefroren und anschließend bei 37° inkubiert. Die der Immunoelktrophorese vorausgehende Inkubation betrug 3–4 Stdn. bei den mit Leukocyten-Thrombocyten, und 24 Stdn. bis 11 Tage bei den mit Erythrocyten versetzten Seren. Auch hier wurden jeweils Kontrollen mit unzerstörten Blutzellen mitgeführt.

Seren der 3 Gc-Typen wurden mit kristallinem Pepsin, Trypsin, Bakterienprotease und Carboxypeptidase fermentiert, und zwar:

- a) jeweils 1,0 ml Serum mit 1,0, 2,0 und 3,0 mg Pepsin; Inkubationszeit: 4 Stdn. bei 37° ;
- b) jeweils 0,5 ml Serum mit 0,5 und 1,0 mg Trypsin; Inkubationszeit: 4 Stdn.;

c) jeweils 1,0 ml Serum mit 1,0 mg Bakterienprotease; Inkubationszeit: 25 Min. und 45 Min.;

d) jeweils 1,0 ml Serum mit 10,0 mg Carboxypeptidase; Inkubationszeit: 4 Std.

Mit Ausnahme der Kontrollen wurden allen Proben die oben erwähnten Inhibitoren in einem Parallelversuch vor der Fermentaktivierung im Verhältnis 1:1 bis 1:4 zugesetzt, da die Aktivität der Zellfermente eine unbekannte Größe darstellt.

Ergebnisse

Aus den immunoelektrophoretischen Gc-Bildern ergab sich:

Trypsin, *Bakterienprotease* und die *Eigenfermente* aus den Blutzellen bewirkten eindeutige Gc-Transformationen. Abbildung 1 zeigt die Fermenteinwirkung des Trypsins (0,5 mg/0,5 ml Serum) nach 4stdg. Inkubation. Bei allen 3 Gc-Typen beginnt sich ein mit dem Gc-Protein identisches „ α_1 -Globulin“ horizontal abzuspalten. Die Pfeile markieren den Beginn der Aufspaltung. Das α_2 -Makroglobulin fängt an, sich anodenwärts zu verschieben. Die Buchstaben A, C und E bezeichnen jeweils die Gc-Defekttypen 1-1, 2-1 und 2-2, die Buchstaben B, D und F die entsprechenden Kontrollen.

Verdoppelt man die Trypsindosis, so wird die Transformation noch deutlicher (Abb. 2). Der 1-1-Typ weist jetzt ein klar erkennbares „ α_1 -Globulin“ auf; der Gc 2-1-Typ ist offensichtlich in 3 hintereinander liegende Fragmente gespalten, und der Gc 2-2-Bogen hat sich gestreckt und ist deutlich verlängert, so daß ein dem Typ 2-1 ähnliches Bild resultiert.

Die Einwirkung der Bakterienprotease (1,0 mg/1,0 ml Serum) bei 25 Min. Inkubation zeigt, daß der 1-1-Typ mit dem α_2 -Makroglobulin anodisch gewandert ist und sich zur Kathode und Anode hin in 3 Fragmente aufzusplittern beginnt (Abb. 3). Für den Gc-Typ 2-1 gilt das gleiche. Hier erkennt man gut die Linie des sich absplittenden „ α_1 -Globulins“. Die Gc 2-2-Linie ist über dem deutlich anodisch gewanderten α_2 -Makroglobulin

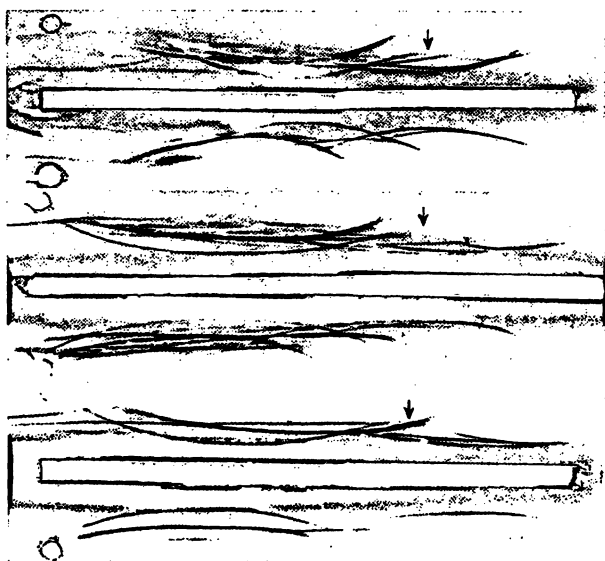


Abb. 1

Transformation der 3 trypsinbehandelten Typen Gc 1-1 (A), Gc 2-1 (C) und Gc 2-2 (E) nach 4stündiger Inkubation. Entsprechende Kontrollseren bei B, D und F. Die Pfeile kennzeichnen das sich absplittende α_1 -Globulin

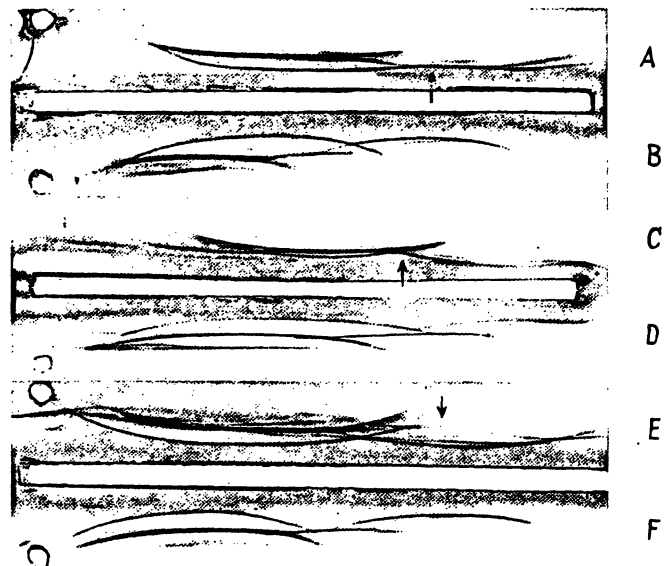


Abb. 2

Nach doppelter Trypsindosis deutliche Ausbildung des α_1 -Globulins bei Gc 1-1 (A) und Aufspaltung des Typs 2-1 in 3 Fragmente (C)

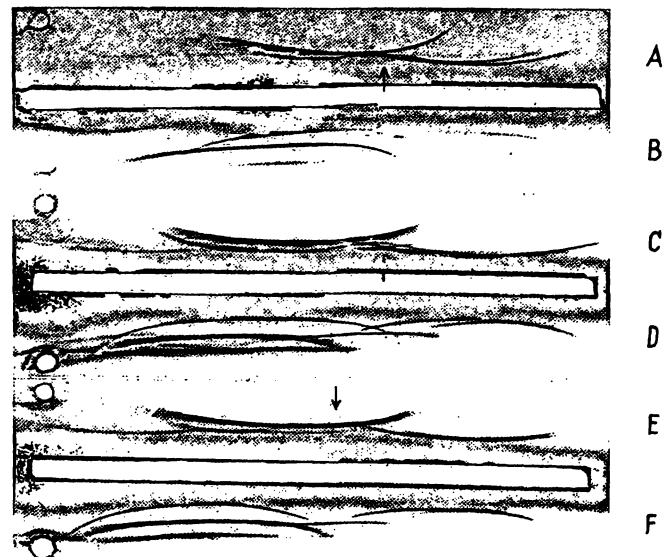


Abb. 3

Fermenteinwirkung der Bakterienprotease nach 25 Min. Inkubation. Aufspaltung aller Gc-Präzipitate in Fragmente (A, C und E). Der Übergang in ein α_1 -Globulin ist hier beim Typ 2-1 besonders deutlich (C)

nahezu völlig in einen kathodalen und einen anodalen Anteil getrennt!

Nach längerer Inkubationszeit mit der Bakterienprotease (45 Min.) stellt sich das „ α_1 -Globulin“ des 1-1-Typs deutlicher dar (Abb. 4); im übrigen imponiert der 1-1-Typ als lang ausgezogene Linie zwischen Start und Albumin. Gc 2-1 und 2-2 zeigen eine fortgeschrittene Aufspaltung, und alle 3 Typen erscheinen zur Kathode hin abgeschwächt.

Die Einwirkung der Leukocytenfermente (0,001 ml/Leukocytenaufschwemmung/0,2 ml Serum) nach 4stdg. Inkubation läßt erkennen, daß der 1-1-Typ zuerst der Transformation unterliegt, dann der Gc 2-1-Typ und schließlich der Typ 2-2 (Abb. 5).

Die 10fache Thrombocyten-Leukocytenextraktdosis bewirkt nach gleicher Inkubationszeit eine weitgehende

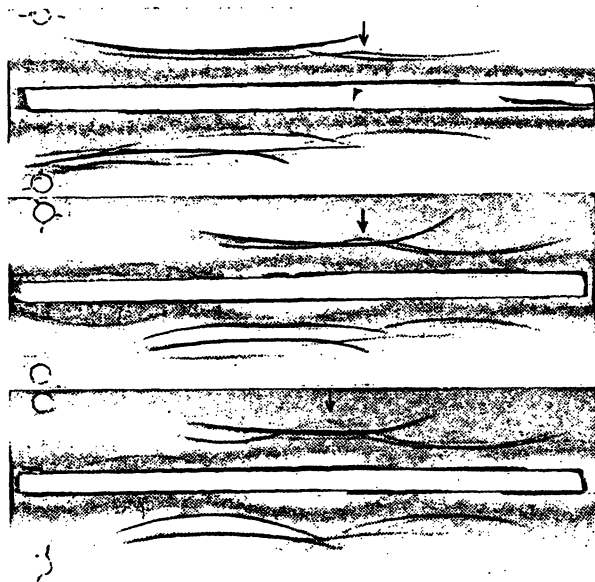


Abb. 4

Versuch wie unter Abb. 3 nach 45 Min. Inkubation. Fortgeschrittene Aufspaltung und kathodenwärts Abschwächung der Gc-Linien

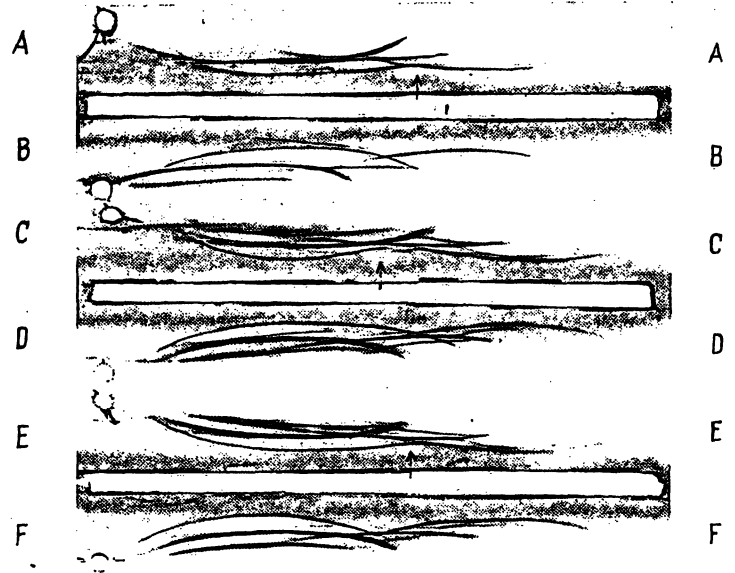


Abb. 6

Versuch wie unter Abb. 5 nach 10facher Menge Leuko- und Thrombocyten sediment. Stadium der Transformation, das zu Fehldiagnosen führt. Gc 1-1 kann fälschlich als 2-1 (A), Gc 2-1 als 2-2 (C) und Gc 2-2 als 2-1 (E) abgelesen werden

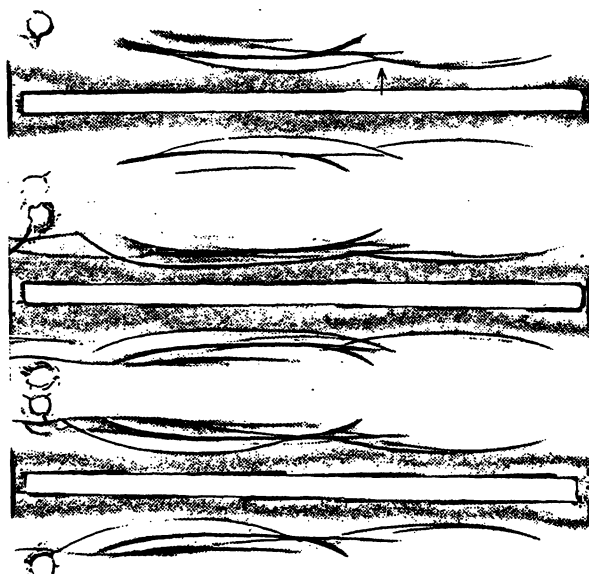


Abb. 5

Einwirkung der Leuko- und Thrombocytenfermente nach 4 Stdn. Inkubation. Bei Gc 1-1 ist bereits die Transformation in ein α_1 -Globulin zu erkennen

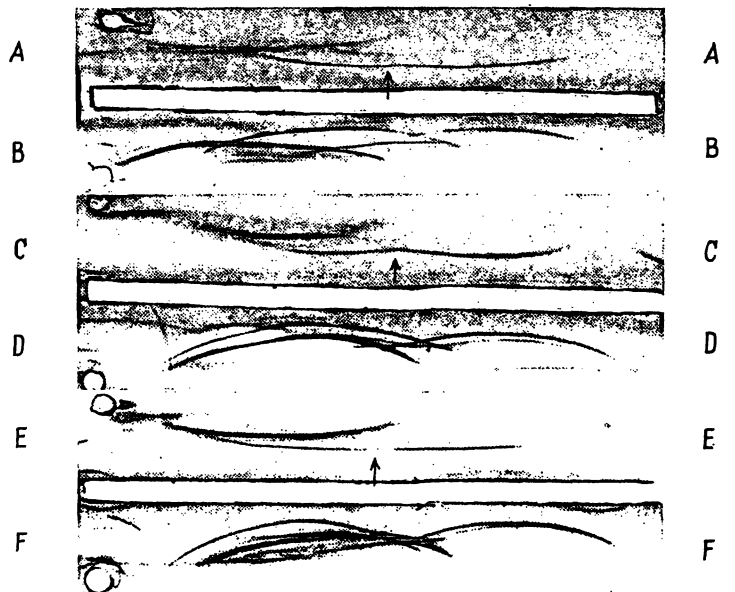


Abb. 7

Versuch wie unter Abb. 5 nach 100facher Menge Leuko- und Thrombocyten sediment. Vollständige Transformation aller Gc-Typen in ein α_1 -Globulin. Das gleiche Bild entsteht nach Gefrierhämolyse am Vollblut oder Citratblut

Umwandlung aller 3 Typen. Bei oberflächlicher Betrachtung imponiert der Gc-Typ 1-1 wie ein 2-1, der Typ 2-1 wie ein 2-2 und der Typ 2-2 wie ein 2-1 (Abb. 6). Bei weiterer Erhöhung der Extraktdosis um den Faktor 10 bietet sich das gleiche Bild wie nach Gefrierhämolyse am frischen Vollblut: alle 3 Typen gehen in ein „ α_1 -Globulin“ über. Eine Diagnose ist nicht mehr möglich (Abb. 7).

Offensichtlich haben auch die Erythrocyten, wenn auch in weitaus geringerem Maße, proteolytisch wirksame Enzymaktivitäten. Nach 24 Stdn. Inkubation leukocytenfreien Erythrocytenhämolysates mit frischen Seren bietet sich folgendes Bild: Der Gc 1-1-Typ zeigt eine Verdoppelung des Bogens, das zugehörige α_2 -

Makroglobulin eine deutlich verminderte elektrophoretische Beweglichkeit. Die Diagnostik des Gc-Typs 2-1 bereitet durch seine gegenläufige Verschiebung zum α_2 -Makroglobulin jetzt schon Schwierigkeiten (Abb. 8). Nach 4 Tagen Inkubation ist nunmehr das zum Gc 2-1 zugehörige α_2 -Makroglobulin eindeutig geringer gewandert, so daß der Gc 2-1-Typ, der übrigens ganz zart angedeutet ein „ α_1 -Globulin“ erkennen läßt, als Gc 1-1 diagnostiziert werden könnte. Am wenigsten beeinflußt scheint der Typ 2-2 zu sein. Es fällt aber auf, daß gerade hier ein weiterer „Bezugsbogen“, das α_1 -Glykoprotein, nicht mehr an typischer Stelle, sondern — infolge veringerteter Wanderungsgeschwindigkeit — zum α_2 -Globulinbereich hin verschoben, erkennbar ist (Abb. 9).



Thermoblock TB 4

elektrisch beheizt, regelbar von 30—330° C, für thermische Aufschlüsse, u. a. zur Stickstoffbestimmung biol. Substanzen, mikroanalyt. Untersuchungen in Laboratorien der

**Biochemie
Mikrobiologie
Klinische Chemie**

Saubere Arbeitsweise — einfache Handhabung — rasche und zuverlässige Funktion. Fordern Sie Prospekte vom Fachhandel an oder direkt von uns.

Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH
Dr. hab. K. Slevogt · 812 Weilheim · Tel. (0881) 26 38/2784

Verkaufsbüros: Essen, Lönsberg 22, Tel. 510019
Hagen, Hesterstraße 64, Tel. 458 57
Bad Nauheim, Frankfurter Str. 39, Tel. 48 60

ARBEITSMETHODEN
DER MODERNEN NATURWISSENSCHAFTEN
Herausgegeben von Prof. Dr. KURT FISCHBECK

Dorfner

Ionenaustauscher

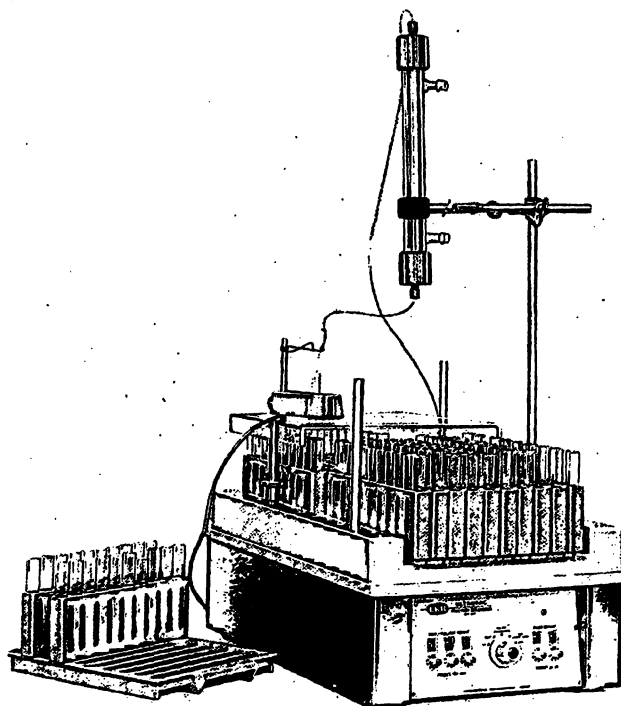
Eigenschaften und Anwendungen

Von Dr. phil. KONRAD DORFNER
Diplom-Chemiker

2., neubearbeitete und erweiterte Auflage
Mit 58 Abbildungen und 27 Tabellen.
Oktav. VIII, 208 Seiten. 1964. Plastikeinband DM 28,—

Die knappe Form der Darstellung wie auch die übersichtliche Gliederung und Beifügung von ausgewählten wesentlichen Tabellen und Abbildungen ermöglicht die rasche Information über Ionenaustauscher und ihre Anwendung. Dabei erweisen sich die als Beispiele für die Anwendung dargestellten Arbeitsvorschriften als wertvolle Ergänzung. *Berichte über die gesamte Biologie*

Walter de Gruyter & Co · Berlin



LKB-Fraktionensammler UltraRac

Der neue Fraktionensammler mit minimalem Platzbedarf. Hohe Leistung und Betriebssicherheit, großes Fassungsvermögen, sowie modernster Bedienungskomfort. Eingebaute Regelelektronik, auch Fernsteuerung möglich. Der UltraRac erlaubt Verteilung nach Zeit, Tropfenzahl oder Volumen.

Alleinvertretung für Deutschland:

Colora Meßtechnik GmbH
7073 Lorch/Württ. Postfach 5
T (07172) 60 41, FS 07-248 886

Technische Büros (Verkauf und Kundendienst):

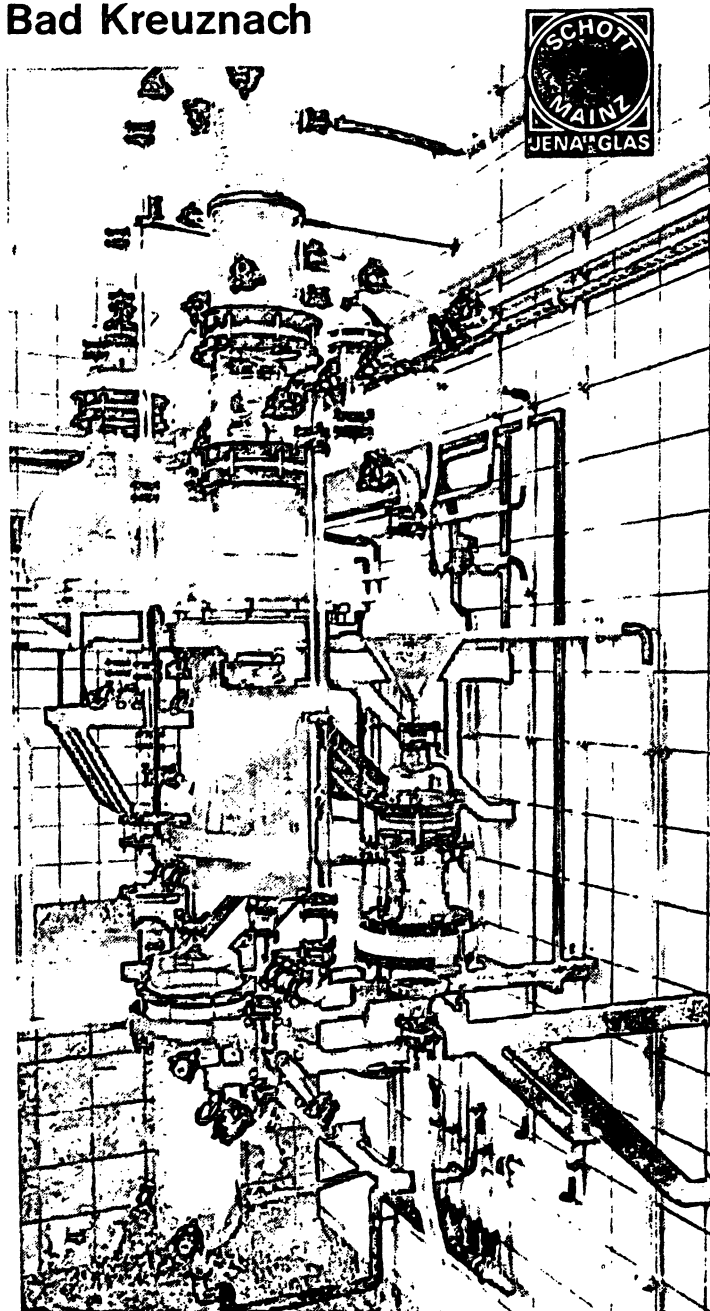
1000 Berlin 30, Kurfürstenstraße 84, T 13 52 00
2000 Hamburg 19, Osterstraße 63, T 40 06 06
4000 Düsseldorf, Kronprinzenstr. 62, T 178 60, FS 08-587 253
6000 Frankfurt (Main), Liebigstr. 24, T 72 96 13, FS 04-11 216
8000 München 2, Dachauer Straße 175, T 516 98 58

colora

AQUA PRO INJECTIONE

Wir liefern Destillierautomaten mit Leistungen bis 500 l/h. Die hervorragenden Eigenschaften des Spezialglases DURAN 50® und die ausgereifte Konstruktion der Anlagen garantieren Wasserqualitäten, die den Forderungen der internationalen Pharmakopöen entsprechen. Deshalb werden vorzugsweise unsere Anlagen in der pharmazeutischen Industrie und in Krankenhäusern sowie Blutspendezentralen eingesetzt . . .

. . . z. B. in der Blutspendezentrale
Bad Kreuznach



SCHOTT
JENA^{ER} GLASWERK SCHOTT & GEN., MAINZ

T 40 B

Magenoperation und Magenoperierter

Herausgegeben von

Prof. Dr. med. Heinrich Bartelheimer
Direktor der I. Medizinischen Universitäts-Klinik Hamburg

Prof. Dr. med. Hans-Joachim Maurer
Institut und Klinik für Medizinische Strahlenkunde
der Universität Düsseldorf

Prof. Dr. med. Hans W. Schreiber
Chefarzt der Chirurgischen Abteilung des Marien-Krankenhauses,
Hamburg

unter Mitwirkung von

Priv.-Doz. Dr. med. Kurt Müller-Wieland
Oberarzt der I. Medizinischen Universitäts-Klinik Hamburg

Groß-Oktav. XVI, 489 Seiten. Mit 210 Abbildungen und
2 mehrfarbigen Tafeln. 1969. Ganzleinen DM 88,—

Durch die Zusammenarbeit verschiedener Disziplinen und durch die Entwicklung neuer Methoden sind in der Gastrologie neue Erkenntnisse über Form und Funktion des gesunden und kranken Magens gewonnen worden. Die *chirurgischen* Leistungen wurden durch die Einbeziehung *internistischer, röntgenologischer, nuklearmedizinischer* und vor allen Dingen *biochemischer Verfahren* ergänzt. Gastroenterologen, Chirurgen, Röntgenologen, Hämatologen, Osteologen und Pädiater sowie Vertreter anderer Fächer haben aus diesen Gründen hier die Probleme der Magenoperation und der Magenoperierten dargestellt. Erst langjährige und vergleichende Erfahrungen gestatten eine kritische Bewertung, wie sie jetzt hier vorgelegt wird.

Das Buch wendet sich an *alle* Disziplinen der Medizin. Verbindliche und eindeutige Aussagen zur Diagnostik und zum therapeutischen Vorgehen finden der *praktizierende Arzt*, der die erste Indikation zu stellen hat, *ebenso wie Gastroenterologen, Internisten, Chirurgen und Röntgenologen.*



Walter de Gruyter & Co - Berlin

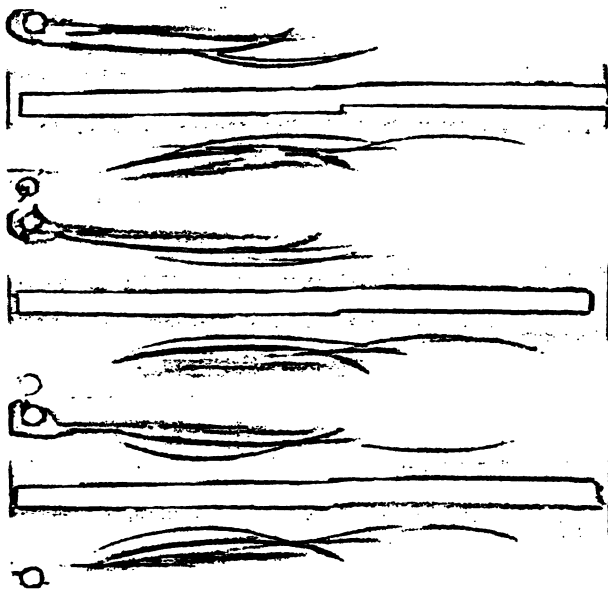


Abb. 8

Einwirkung der proteolytischen Erythrocytenfermente nach 24stdg. Inkubation. Verdoppelung des Bogens bei Gc 1-1 und Verminderung der Laufgeschwindigkeit des zugehörigen α_1 -Makroglobulins (A)

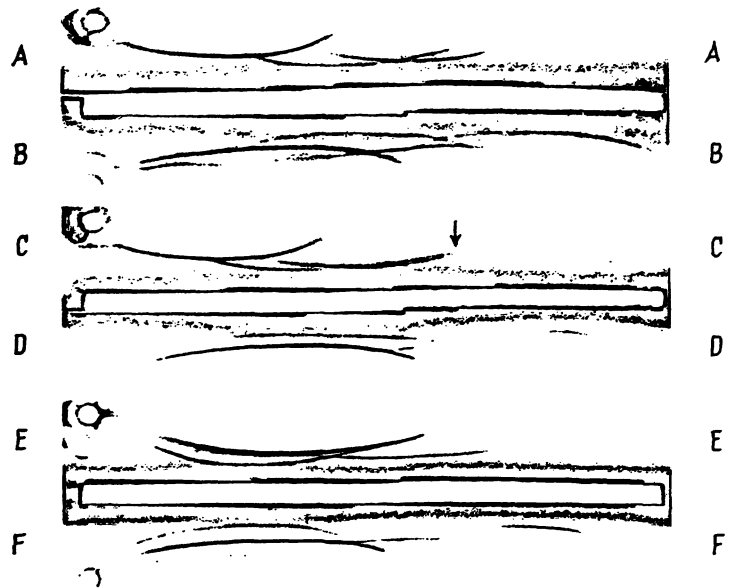


Abb. 9

Versuch wie unter Abb. 8 nach 4 Tagen Inkubation. Transformation des Gc 2-1 in ein α_1 -Globulin, das außerdem wie ein Gc 1-1 imponiert (C)

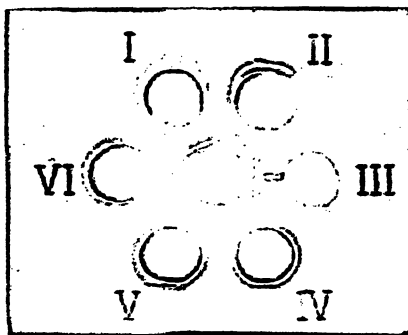


Abb. 10

Nachweis der immunologischen Identität der durch Proteolyse verursachten Fragmente des Gc-Globulins. Ouchterlony-Technik. Mitte: monospezifisches Anti-Gc-Serum vom Kaninchen; I Vollblut; II Serum; III Serum + Trypsin; IV Serum + Bakterienprotease; V Serum + Leuko- und Thrombocytenaufschwemmung; VI gefrierhämolysiertes Vollblut

Im Agargeldiffusionstest ließ sich beweisen, daß sogar nach schwersten proteolytischen Veränderungen der Gc-Typen ihre immunologische Identität erhalten blieb. Abbildung 10 gibt die eindeutig koaleszierenden, wenn auch zum Teil etwas abgeschwächten Präzipitatlinien wieder. Die Sechserrosette war folgendermaßen beimpft: in der Zentralhöhlung monospezifisches Anti-Gc-Serum, in Höhlung I frisches Vollblut, in II frisches Serum, in III mit Trypsin fermentiertes Serum, in IV mit Bakterienproteinase fermentiertes Serum, in V Serum und Leukocyten-Thrombocytenaufschwemmung, in VI gefrierhämolysiertes Vollblut.

Ohne fermentative Einwirkung waren selbst im Überschuß zugesetztes kristallines Pepsin sowie die Carboxypeptidase, die definitionsgemäß nur Polypeptide zu spalten vermag.

Mit Ausnahme des Trypsins, das sich durch Trasylol vollständig, durch Diisopropylfluorophosphat weniger befriedigend hemmen ließ, wurde keines der zelleigenen und der Fremdfermente gehemmt.

Die mitgeführten Kontrollen an Vollblut-, Citratblut- und Serumproben sowie an den mit Aufschwemmungen unzerstörter Leukocyten und Erythrocyten versetzten Seren waren negativ.

Diskussion

Die Transformation der Proteine ist abhängig von der Konzentration des Fermentes, von der Zeitdauer seiner Einwirkung und vom Temperaturoptimum. Insofern war das Ausmaß der Proteinschädigung experimentell steuerbar. Nicht zu beeinflussen war hingegen die Transformation des Gc-Proteins am gefrierhämolysierten Vollblut. So genügte bereits das 1–2malige Einfrieren und Auftauen mit anschließender Inkubation von 1 Std., ja sogar das kurze Aufbewahren im Kühlschrank, um die gleichen Gc-Veränderungen zu provozieren wie etwa nach 4stdg. Inkubation bei 37°. Es fällt ferner auf, daß das α_2 -Makroglobulin durch die zelleigenen Fermente stets wesentlich stärker in seiner Position und auch in seiner Konturenschärfe verändert wurde als durch die zugesetzten proteolytischen Fermente. Diese Beobachtung stützt gleichfalls die Annahme, daß die Kathepsine in ihrer Proteinsubstratspezifität nicht mit den Verdauungsfermenten identisch und offenbar in der lebenden Zelle funktionslos sind und erst nach Absterben der Zelle wirksam werden.

Die durch Einwirkung von Erythrocytenfermenten hervorgerufenen Proteinveränderungen stehen im Gegensatz zu den Befunden von NERSTRÖM (6), der keine Gc-Veränderungen, allerdings nach nur 18stdg. Inkubationszeit, beobachtet hat. Sie bestätigen jedoch die Befunde von HASCHEN (30, 31) über die in den Erythrocyten vorhandenen proteolytischen Enzyme, deren Fermentaktivität naturgemäß wesentlich geringer ist als die der Leukocyten, wie es auch aus den Versuchen zu ersehen ist. Trotz wesentlich längerer Inkubationszeit wurden weitaus geringere Transformationen induziert.

Daß es sich hier in der Tat um proteolytische Enzyme und nicht um eine Vortäuschung dieser Enzyme durch Einwirkung bakterieller Proteasen handelt, geht weiterhin aus der Versuchsanordnung hervor. Es ließ sich nämlich zeigen, daß die unter möglichst sterilen Bedingungen nach 11-tägiger Inkubation aufgetretenen Proteinveränderungen mit den nach 4 Tagen Inkubation erzielten völlig identisch waren. Für die Praxis ergibt sich jedenfalls hieraus, daß man bereits bei mehr oder weniger starker Hämolyse und nicht erst nach Zerfall der Leukocyten und Thrombocyten mit Gc-Transformationen, die zu Fehldiagnosen führen können, rechnen muß. Dies gilt besonders für Blutproben, die bei mehrstäigem Transport hochsommerlichen Temperaturen ausgesetzt waren.

Die Ergebnisse erklären zwangsläufig auch die Beobachtungen von NERSTRØM (6) über atypische Gc-Muster an Blutfleckenextrakten. Sie erklären auch die Befunde von HIRSCHFELD und Mitarbeitern (48) über das Auftreten eines α_1 -Globulins in Nabelschnurbluten bei Morbus haemolyticus neonatorum. In beiden Fällen muß eine Freisetzung der intrazellulären proteolytischen Enzyme (Kathepsine) durch die Hämolyse angenommen werden.

Die durch bakterielle und leukocytaire Proteasen hervorgerufenen Proteinveränderungen haben nun eine gewisse Ähnlichkeit mit der von HENNIG und HOPPE (49) beschriebenen Gc-Variante „Gc Z“. Der Verdacht eines Zusammenhanges dieser Veränderungen mit den Gc-Varianten drängt sich auf. Wenn man jedoch berücksichtigt, daß inzwischen hierüber drei weitere, jeweils durch Nachuntersuchungen bestätigte Beobachtungen vorliegen (50, 51, 63), wird man eine Vortäuschung dieser Varianten durch enzymatische Einflüsse ausschließen und die Annahme eines zusätzlichen Allels am Gc-Locus, Gcz, als berechtigt ansehen können. Schließlich darf eines nicht übersehen werden: wenn fermentativ induzierte Gc-Transformationen eine Gc-Variante Gc Z vortäuschen könnten, müßten die zwangsläufig mit diesen Defekttypen auftretenden *allgemeinen* Proteinveränderungen diese Fehldeutung erkennen lassen; denn jede induzierte Gc-Transformation führt auch zu Veränderungen einiger anderer Serumproteine. Bei Anwendung eines polyvalenten Antiserums lassen sich beispielsweise nach Transformation des Gc-Typs durch leukocytaire Fermente auch schwere proteolytische Veränderungen des Albumins, des α_1 -Glyko- und Lipoproteins und des α_2 -Makroglobulins nachweisen (Abb. 11).

Die Nichthemmbarkeit der zelleigenen Fermente beweist, daß mindestens in bezug auf die *Proteinsubstrat-*

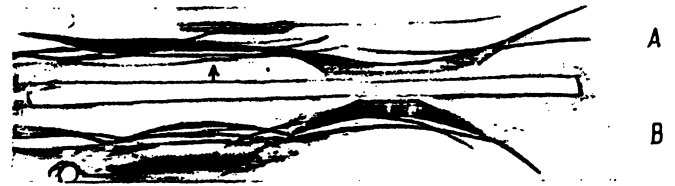


Abb. 11

Durch Leukocytenfermente induzierte Positionsänderungen und Transformationen des Albumins, α_1 -Glykoproteins, α_1 -Lipoproteins und der Gc-Linie 1-1 (A, Pfeil). Anti-Humanserum vom Pferd

spezifität kein Zusammenhang zwischen den Eigenfermenten der Blutzellen und den Verdauungsfermenten besteht. Dies war im Grunde schon deshalb zu vermuten, da offenbar die Antiproteasen des menschlichen Serums, α_1 -Antitrypsin (52), α_1 -Antichymotrypsin (53), Inter- α -Trypsininhibitor (54), α_2 -Antiplasmin oder α_2 -Makroglobulin (55), mit hoher Inhibitorkapazität gegen Trypsin, Chymotrypsin und Plasmin ebenfalls nicht die *zellulären* Kathepsine hemmen können.

Trypsin oder trypsinähnliche Aktivitäten können also für die Gc-Transformationen nicht verantwortlich gemacht werden. Auch Pepsin oder pepsinähnliche Proteasen können für die Gc-Transformation nicht ursächlich sein. Die Unwirksamkeit des experimentell im Überschuß zugesetzten kristallinen Pepsins ist erklärlich, da sein Wirkungsoptimum bei pH-Werten von 1,5 bis 2,5 liegt und es bei Werten über 6 instabil wird. Der pH-Wert des Blutes ändert sich nicht wesentlich nach Gefrierhämolyse und liegt nach eigenen Messungen selbst bei gefautem 2 Jahre alten Blut noch zwischen pH 7 und 8. Offenbar wird dieser Wert durch die Alkalireserve des Blutes sowie die Pufferwirkung der Plasmaeweißkörper als Ampholyte auch außerhalb des Organismus sehr lange aufrechterhalten.

Abschließend ist festzustellen, daß nach Kontamination des Serums mit Bakterien oder mit zellulären Proteasen *jeder* der 3 Gc-Typen zu Fehlbestimmungen Veranlassung geben kann. Von PROKOP (56) vorgeschlagene Versuche, durch fermentative Behandlung der menschlichen Seren zusätzliche, möglicherweise genetisch determinierte, latent vorhandene Polymorphismen im Gc-System darzustellen, wie es beispielsweise bei den Transferrinen (57, 58, 59, 60) und einem α_1 - und β -Globulin beschrieben worden ist (61, 62), erscheinen daher wenig erfolgversprechend. Eine Fermentierung erschwert die Gc-Klassifizierung unnötigerweise oder führt sogar zu völlig unbrauchbaren Resultaten.

Den Firmen Bayer (Leverkusen) und Novo Industrie (Mainz) sei an dieser Stelle für die Überlassung von Präparaten und Fermenten gedankt.

Literatur

1. SCHULTZE, H. E. und G. SCHWICK, Behringwerk-Mitt. 8, 11 (1957). — 2. LEITHOFF, H. und I. LEITHOFF, Dtsch. Z. gerichtl. Med. 54, 286 (1963). — 3. HEIPER, U. und M. BOLKENIUS, Dtsch. Z. gerichtl. Med. 58, 76 (1966). — 4. FORSTER, B. und H. JOACHIM, Dtsch. Z. gerichtl. Med. 63, 98 (1968). — 5. NERSTRØM, B., Acta pathol. microbiol. Scand. 57, 495 (1963). — 6. NERSTRØM, B., Acta pathol. microbiol. Scand. 60, 540 (1964). — 7. NERSTRØM, B. und I. SKAFTE JENSEN, Acta pathol. microbiol. Scand. 58, 257 (1963). — 8. NERSTRØM, B., B. MANSA und W. FREDERIKSEN, Acta pathol. microbiol. Scand. 61, 474 (1964). — 9. STÖSS, B. und H. PETTENKOFER, Zbl. Bakt. I Orig. 190, 277 (1963). — 10. JØRGENSEN, G., Humangenetik 1, 303 (1965). — 11. CLEVE, H. und A. BEARN, Progr. med. Genet. 2, 64 (1962). — 12. CLEVE, H., Die gruppenspezifischen Komponenten des menschlichen Serums.

- Hüthig-Verlag Heidelberg (1965). — 13. REINSKOU, T., *Vox Sang.* 11, 70 (1966). — 14. STEIN, U. und D. PLATT, *Klin. Wschr.* 46, 1145 (1968). — 15. COFFEY, J. und C. DE DUVE, *J. biol. Chemistry* 243, 3255 (1968). — 16. FINKENSTÄDT, J. T., *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* 95, 302 (1957). — 17. BARRETT, A., *Biochem. J.* 104, 601 (1967). — 18. BOUMA, J. und M. GRUBER, *Biochim. biophysica Acta Amsterdam* 113, 350 (1966). — 19. FRUTON, J. S., Cathepsins, in: BOYER, P., H. LARDY und K. MYRBÄCK, *The Enzymes*, Bd. IV, 2. Aufl., S. 233ff., Academic Press, New York-London (1960). — 20. PANTLITSCHKO, M. und K. STATTMANN, *Biochem. Z.* 326, 252 (1955). — 21. HASCHEN, R. und K. KRUG, *Z. ges. inn. Med.* 20, 346 (1965). — 22. HASCHEN, R. und K. KRUG, *Nature (London)* 209, 511 (1966). — 23. FREI, J., CL. BORELL, G. HORVATH, B. CULLITY und A. VANNOTTI, *Blood* 18, 317 (1961). — 24. MOUNTER, L. und W. ATIYEH, *Blood* 15, 52 (1960). — 25. STILES, M. A. und J. FRAENKEL-CONRAT, *Blood* 32, 119 (1968). — 26. RAPOPORT, S., *Medizinische Biochemie*, 4. Aufl., Volk und Gesundheit, Berlin (1966). — 27. BEESE, J., W. FARR, E. GRÜNER und R. HASCHEN, *Klin. Wschr.* 44, 1049 (1966). — 28. HASCHEN, R., *Fol. haematol.* 85, 288 (1966). — 29. OHLER, W., *Klin. Wschr.* 46, 737 (1968). — 30. HASCHEN, R., F. GROH, N. REHFELD und W. FARR, *Acta biol. med. german.* 13, 493 (1964). — 31. HASCHEN, R., W. FARR und F. GROH, *Fol. haematol.* 83, 207 (1965). — 32. MORRISON, W. und H. NEURATH, *J. biol. Chemistry* 200, 39 (1953). — 33. BETKE, K., *Der menschliche rote Blutfarbstoff bei Fetus und reifem Organismus*. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1954). — 34. VOGEL, R., I. TRAUTSCHOLD und E. WERLE, *Natürliche Proteinase-Inhibitoren*, G. Thieme-Verlag, Stuttgart (1966). — 35. TRAUTSCHOLD, I., E. WERLE und G. ZICKGRAF-RÜDEL, *Arzneimittelforsch. Aulendorf* 16, 1507 (1966). — 36. KRAUT, H. und N. BHARGAVA, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 334, 236 (1963). — 37. KRAUT, H. und N. BHARGAVA, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 348, 1498 (1967). — 38. BARNHART, M. J., C. QUITANA, H. L. LENON, G. B. BLUHM und I. M. RIDDLE, zit. nach HABERLAND und MATIS, *Med. Welt* 18, 1367 (1967). — 39. JANSEN, E. F., M.-D. F. NUTTING, R. JANG und A. K. BALLS, *J. biol. Chemistry* 179, 189 (1949). — 40. OOMS, A. J. J., *Nature (London)* 190, 533 (1961). — 41. LASKOWSKI sr., M., B. KASELL, R. J. PEANASKY und M. LASKOWSKI jr., Endopeptidasen, in: Hoppe-Seyler/Thierfelder (Hrsg.): *Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse*, Bd. VI/C, 10. Aufl., S. 229ff., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1966). — 42. HANSON, H., Peptidasen (Exopeptidasen), in: Hoppe-Seyler/Thierfelder (Hrsg.): *Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse*, Bd. VI/C, 10. Aufl. S. 1ff., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1966). — 43. FAHRNEY, D. E. und A. M. GOLD, *J. Amer. chem. Soc.* 85, 997 (1963). — 44. HIRSCHFELD, J., *Acta pathol. microbiol. Scand.* 47, 160 (1959). — 45. HIRSCHFELD, J., *Science Tools (LKB-Producter)* 7, 18 (1960). — 46. HILGERMANN, R., diese Z. 5, 317 (1967). — 47. BAITSCH, H., I. KLOSE, K. OMOTO und H. RITTER, *Ärzt. Lab.* 10, 42 (1964). — 48. HIRSCHFELD, J., B. A. NILSON und B. NERSTRØM, zit. nach NERSTRØM, *Acta pathol. microbiol. Scand.* 60, 540 (1964). — 49. HENNIG, W. und H. HOPPE, *Vox Sang.* 10, 214 (1965). — 50. CLEVE, H., M. KRÜPE und A. ENSGRABER, *Humangenetik* 3, 46 (1966). — 51. LUFF, K. und G. ADEBAHR, *Wiss. Z. Univ. Halle* 17, 535 (1968). — 52. SCHULTZE, H. E., K. HEIDE und H. HAUPT, *Klin. Wschr.* 40, 427 (1962). — 53. HEIMBURGER, N. und H. HAUPT, *Clin. chim. Acta Amsterdam* 12, 116 (1965). — 54. HEIDE, K., N. HEIMBURGER und H. HAUPT, *Clin. chim. Acta Amsterdam* 11, 82 (1965). — 55. SCHULTZE, H. E., N. HEIMBURGER, K. HEIDE, H. HAUPT, K. STÖRIKO und H. G. SCHWICK, *Proc. 9th Congr. Europ. Soc. Haematol.*, Lisbon 1963, S. 1315, Karger, Basel-New York (1963). — 56. PROKOP, O., Über neue Aspekte des „immunochemical endgrouping“ und über Serumpolymorphismen. Vortr. 47. Kongr. Ges. gerichtl. Med., Innsbruck 1968. — 57. PARKER, W. C. und A. G. BEARN, *Science Washington* 133, 1014 (1961). — 58. PARKER, W. C. und A. G. BEARN, *J. exper. Med.* 115, 83 (1962). — 59. BLUMBERG, B. S. und L. WARREN, *Biochim. biophysica Acta Amsterdam* 50, 90 (1961). — 60. KAMINSKI, M., *Nature (London)* 194, 27 (1962). — 61. VAN HUNG, N., *Acta biol. med. german.* 21, 249 (1968). — 62. VAN HUNG, N. und G. GESERICK, *Acta biol. med. german.* 21, 679 (1968). — 63. SCHEIBE, E., E. SCHEIBE, E. KOCH und G. BUNDSCHUH, in Dürwald, W. (Hrsg.), *Aktuelle Fragen der gerichtlichen Medizin*, Bd. III, S. 82, Wiss. Beitr. Univ. Halle (1968).

Dr. R. Hilgermann
355 Marburg
Mannkopffstr. 2